



RECEIVED
JUL 10 2001

Docket No. 48811 (70342)

TECH CENTER 1600/2900
#13
DB
7/11/01

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of: Shuji Hinuma, et al.
Serial No.: 09/207,168
Filed: December 7, 1998
For: NOVEL PEPTIDES AND PRODUCTION AND USE THEREOF
Group No: 1647
Examiner: D. Romeo

**Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231**

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that these papers (along with any paper referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service on the date shown below with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to the: Commissioner of Patents and Trademarks, Washington, D.C. 20231.

Date: July 3, 2001

Punita Shah
Punita Shah (type name)

TRANSMITTAL OF CERTIFIED COPIES

Attached please find the certified copies of the foreign applications from which priority is claimed for this case:

Country: JAPAN
Application Number: 8 146052
Filing Date: June 7, 1996

Country: JAPAN
Application Number: 8 247710
Filing Date: September 19, 1996

Country: JAPAN
Application Number: 8 272422
Filing Date: October 15, 1996

July 3, 2001
Date

Respectfully Submitted,

Cara Z. Lowen
Cara Z. Lowen (Reg. No. 38,227)
EDWARDS & ANGELL, LLP
DIKE, BRONSTEIN, ROBERTS & CUSHMAN
Intellectual Property Practice Group
P.O. Box 9169
Boston, MA 02209
(617) 439-4444



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

RECEIVED

JUL 10 2001

TECH CENTER 1600/2900

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

1996年 6月 7日

出 願 番 号

Application Number:

平成 8年特許願第146052号

出 願 人

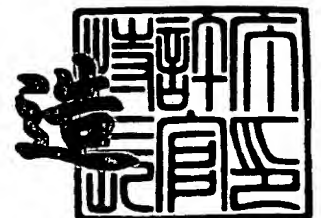
Applicant(s):

武田薬品工業株式会社

2001年 5月18日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3042142

【書類名】 特許願

【整理番号】 A96169

【提出日】 平成 8年 6月 7日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 13/00
C12N 15/12
A61K 48/00

【発明の名称】 新規ペプチド、その製造法および用途

【請求項の数】 15

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市春日 1 丁目 7 番地 9 武田春日ハイツ 1
402号

【氏名】 日沼 州司

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市並木 3 丁目 1 7 番地 6 ロイヤルシティ
並木 302号

【氏名】 福住 昌司

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府堺市南向陽町 1 丁 2 番 8 号

【氏名】 北田 千恵子

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代表者】 武田 國男

【代理人】

【識別番号】 100073955

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100077012

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩谷 龍

【選任した代理人】

【識別番号】 100079647

【弁理士】

【氏名又は名称】 向井 洋

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000051

【包括委任状番号】 9000052

【包括委任状番号】 9000053

【ブルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】新規ペプチド、その製造法および用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチド、その前駆体またはそれらの塩。

【請求項2】前駆体が配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドである請求項1記載の前駆体。

【請求項3】ソマトスタチン様活性またはコルチスタチン様活性を有するペプチドである請求項1記載のペプチドまたはその前駆体。

【請求項4】請求項1記載のペプチドまたは前駆体をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

【請求項5】配列番号：7で表わされる塩基配列を有する請求項4記載のDNA

。

【請求項6】配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11または配列番号：12で表わされる塩基配列を有する請求項4記載のDNA。

【請求項7】請求項4記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項8】請求項7記載の組換えベクターを保持する形質転換体。

【請求項9】請求項8記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のペプチドまたはその前駆体を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項1記載のペプチド、その前駆体またはそれらの塩の製造方法。

【請求項10】請求項1記載のペプチド、その前駆体またはそれらの塩を含有してなる医薬。

【請求項11】請求項4記載のDNAを含有してなる医薬。

【請求項12】ホルモン産生腫瘍、先端巨大症、巨人症、痴呆症、糖尿病もしくは胃潰瘍の治療・予防剤、ホルモン分泌抑制剤、腫瘍増殖抑制剤、または神経活動もしくは睡眠の調節剤である請求項10または11記載の医薬。

【請求項13】請求項1記載のペプチド、その前駆体またはそれらの塩に対する抗体。

【請求項14】請求項1記載のペプチド、その前駆体またはそれらの塩を用いることを特徴とするレセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。

【請求項15】請求項1記載のペプチド、その前駆体またはそれらの塩を含有するレセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な生理活性ペプチド、特にヒト由来のソマトスタチン様活性またはコルチスタチン様活性を有するペプチドおよびその前駆体に関する。

【0002】

【従来の技術】

ソマトスタチンは、成長ホルモン抑制因子としてヒツジ視床下部から単離同定された〔Guillemin, R. et al., サイエンス (Science)、179巻、77-79頁、1973年〕。ソマトスタチンは14個のアミノ酸から成り、3位のCysと14位のCysによるS-S結合によって環状構造をしている（ソマトスタチン-14）。また、ソマトスタチン-14のN端に14個のアミノ酸が付加した、ソマトスタチン-28も同定された。

ソマトスタチンは、広く中枢神経系に分布し、また末梢では膵、消化管などの臓器や末梢神経にも存在する。現在では、成長ホルモンの分泌抑制のみならず、甲状腺刺激ホルモン、プロラクチンなどの下垂体ホルモンや、ガストリン、インシュリンなどの消化管ホルモン分泌を抑制するほか、神経伝達物質としても作用することが知られている〔Brownstein, M. et al., エンドクリノロジー (Endocrinology)、96巻、1456-1461頁、1975年〕。さらに、細胞増殖をも抑制することが明らかにされた。したがって、ホルモンの過剰分泌や腫瘍増殖を抑制する目的で、ソマトスタチンの種々の誘導体が合成され臨床応用が試みられてきた。

スクリプス研究所のチームが、ソマトスタチンに類似した構造を有する新しい神経ペプチドについて報告している。ラットコルチスタチン (cortistatin) と名付けられたこのペプチド（前駆体はプレプロコルチスタチンと呼ばれる）は、

ソマトスタチンと同じく睡眠のうちレム睡眠の相だけを長くする作用がある。しかし、コルチスタチンは、ソマトスタチンとは違う遺伝子の産物で、大脳皮質に低周波数の波を生じさせる。またコルチスタチンは、それ自身がレム睡眠の誘発物質であるアセチルコリンの効果を妨げる。おそらく神経活動や睡眠の調節物質として働いているのだろう [L. de Lecea et al. ネイチャー (Nature) 381, 16 MAY 1996] 。

以上のようにソマトスタチンおよびラットコルチスタチンは構造も非常によく似ており、また種々の重要な生理作用が報告されている。

【0003】

ソマトスタチンの作用は、ソマトスタチンが細胞膜上に存在する高親和性で特異的なレセプター (ソマトスタチンレセプター) と結合し、各種のGTP結合蛋白質を介して細胞内情報伝達系に伝わることによる。1992年に、ソマトスタチンレセプターサブタイプ1 (以下、SSTR1と略称する場合がある) およびサブタイプ2 (以下、SSTR2と略称する場合がある) の構造が決定され、報告された [山田ら、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci., USA)、89巻、251-255頁、1992年]。さらに、サブタイプ3 (以下、SSTR3と略称する場合がある)、サブタイプ4 (以下、SSTR4と略称する場合がある) およびサブタイプ5 (以下、SSTR5と略称する場合がある) をコードするDNAがクローニングされた ([SSTR3; 山田ら、モレキュラー・エンドクリノロジー (Molecular Endocrinology)、6巻、2136-2142頁、1992年] および [SSTR4 および SSTR5; 山田ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 195巻、844-852頁、1993年])。その結果、ソマトスタチンレセプターは、少なくとも5種類のサブタイプから成る遺伝子ファミリーを形成し、互いに42~60%の相同性があることが分かった。

【0004】

コルチスタチンの作用もまた、細胞膜上に存在する高親和性の特異的なレセプターと結合し、各種のGTP結合蛋白質を介して細胞内情報伝達系に伝わること

によると考えられている。実際、コルチスタチン-14は、ラットpituitary cell GH4細胞膜上で、 $[^{125}\text{I}]$ 標識ソマトスタチンの結合に対してソマトスタチンと同様のdisplacementを示す [L. de Lecea et al. ネイチャー(Nature) 381, 16 MAY 1996]。しかしながら、ソマトスタチン-14とコルチスタチン-14はラットの脳室内投与において睡眠等に対する効果は異なっており、ソマトスタチンレセプターサブタイプあるいはソマトスタチン類似のレセプター間に対する各々のペプチドの親和性、作用点の違いが予想される。さらに、コルチスタチンはソマトスタチンレセプター以外のレセプターについても作用することが示唆されている。例えば、ソマトスタチンレセプターに高いホモロジーを示すけれど、ソマトスタチンとの結合が確認できていないレセプターとして、GPR7 (U22491) とGPR8 (U22492) が報告されている [Genomics 28, 84-91 (1995)] が、コルチスタチンはこの様なレセプターに対して作用する可能性も考えられる。以上のように、コルチスタチンについては生体内において特異的なレセプターを介して生理機能の調節において重要な役割を果たしているものと考えられているが、ヒトに関するソマトスタチン様またはコルチスタチン様ペプチドについては、これまで全く知られていなかった。

cDNAライブラリーからランダムに選んだcDNAクローンの部分配列 (expressed sequence tags, ESTs と略される) を決定することにより、その臓器や細胞における遺伝子発現のレベルや新規遺伝子を見いだす試みが報告されている。M. D. Adamsらは脳のcDNAライブラリーから得たESTsを多数報告している (ネイチャー ジェネティクス、4巻、373-380頁、1993年)。HGS (Human Genome Science社) のヒト由来のESTのうち、HGS289122と1330029は、前出のラットプレプロコルチスタチンの配列 (U51919) に対して高い相同性を示すことがホモロジーサーチの結果明らかとなった。しかし、ESTsの配列は正確性に欠け、かつ一部分の塩基配列であることから、データベースに登録されているESTsの塩基配列と同一の遺伝子が実際に存在し、かつ生体内で機能しているかどうかは明らかではなかった。

【0005】

新たなヒト由来の新規な生理活性ペプチドは、急性バクテリア髄膜炎、急性心

筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症（骨粗鬆症の予防）、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、神経変成疾患等の予防や治療に役立つ新たな医薬品の開発を可能にする。そこで、本発明の分野では、上記種々の疾病に対する治療・予防剤として有用なヒト由来の新規なソマトスタチン様またはコルチスタチン様ペプチドを見だし、大量に生産する方法の開発が望まれていた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、有用な生理活性を有する新規ペプチド、その前駆体またはそれらの塩、該ペプチドまたはその前駆体をコードするDNA、組換えベクター、形質転換体、該ペプチドまたはその前駆体の製造方法、該ペプチドまたはその前駆体を含有してなる医薬、該ペプチドまたはその前駆体に対する抗体、およびソマトスタチンレセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法ならびにスクリーニング用キットに関する。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ESTの配列情報を基にプライマーを作製し、ヒト脳poly(A)⁺RNAを鋳型とするRT-PCRにより、新規な塩基配列を有するcDNAをクローニングすることに成功した。そして、本発明者らは、得られたcDNAにコードされるタンパク質が有用なソマトスタチン様またはコルチスタチン様ペプチドであることを見だし、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- (1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチド、その前駆体またはそれらの塩、
- (2) 前駆体が配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチド第(1)項記載の前駆体、
- (3) ソマトスタチン様活性またはコルチスタチン様活性を有するペプチドである第(1)項記載のペプチドまたはその前駆体、
- (4) 第(1)項記載のペプチドまたは前駆体をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、
- (5) 配列番号：7で表わされる塩基配列を有する第(4)項記載のDNA、

【0008】

- (6) 配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11または配列番号：12で表わされる塩基配列を有する第(4)項記載のDNA、
- (7) 第(4)項記載のDNAを含有する組換えベクター、
- (8) 第(7)項記載の組換えベクターを保持する形質転換体、
- (9) 第(8)項記載の形質転換体を培養し、第(1)項記載のペプチドまたはその前駆体を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする第(1)項記載のペプチド、その前駆体またはそれらの塩の製造方法、
- (10) 第(1)項記載のペプチド、その前駆体またはそれらの塩を含有してなる医薬、

(11) 第(4)項記載のDNAを含有してなる医薬、

(12) ホルモン産生腫瘍、先端巨大症、巨人症、痴呆症、糖尿病もしくは胃潰瘍の治療・予防剤、ホルモン分泌抑制剤、腫瘍増殖抑制剤、または神経活動もしくは睡眠の調節剤である第(10)項または(11)項記載の医薬、

(13) 第(1)項のペプチド、その前駆体またはそれらの塩に対する抗体、

(14) 第(1)項記載のペプチド、その前駆体またはそれらの塩を用いることを特徴とするレセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、および

(15) 第(1)項記載のペプチド、その前駆体またはそれらの塩を含有するレセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用キットを提供する。

【0009】

本発明のペプチドは、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドである。本発明のペプチドは、例えば、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髓細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、腸管、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節などに由来するペプチドであってもよく、また合成ペプチドであってもよい。

【0010】

また、本発明のペプチドは、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有す

るペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドであれば何れのものでもよい。すなわち、本発明のペプチドは、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドのムテインであってもよい。実質的に同質の活性としては、例えば、ソマトスタチン様活性、コルスタチン様活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、ソマトスタチン様活性やコルスタチン様活性の程度、ペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。

本発明のペプチドのムテインとしては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1～5個程度のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、または配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1～5個程度のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。欠失型ムテインとしては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のN末端から2個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列を有するペプチド（配列番号：2）などが用いられる。ただし、配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を有するペプチド（公知のラット由来コルチスタチン、図3のr cortistatin）および配列番号：23で表わされるアミノ酸配列を有するペプチド（公知のラット由来ソマトスタチン、図3のr somatostatin）は本発明のペプチドから除かれる。

さらに、本発明のペプチドには、上記したペプチドにおいて、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-OH$ 、 $-COOH$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

【0011】

本発明の前駆体は、上記した本発明のペプチドを含有するものであれば何れのパペチドまたはタンパク質であってもよい。例えば、本発明のペプチドのN末端側もしくはC末端側に1個または2個以上のアミノ酸が付加したペプチドまたは

タンパク質などが用いられる。なかでも、本発明のペプチドのN末端側に1個または2個以上のアミノ酸が付加したペプチドまたはタンパク質が好ましい。

より具体的には、本発明の前駆体としては、例えば、本発明のペプチド、好ましくは配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドのN末端側に、配列番号：21で表わされる表わされるアミノ酸配列（88個のアミノ酸）のC末端側から数えて1個または2個以上のアミノ酸が付加したペプチドなどが用いられる。例えば、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列を含有する前駆体ペプチドなどの他、これらペプチドのムテインも含まれる。

【0012】

これらペプチドのムテインとしては、例えば、

(1) 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列中の1～10個程度のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列に1～15個程度のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列中の1～8個程度のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有するペプチド、

(2) 配列番号：4で表わされるアミノ酸配列中の1～15個程度のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列に1～10個程度のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列中の1～20個程度のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有するペプチド、

(3) 配列番号：5で表わされるアミノ酸配列中の1～10個程度のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列に1～10個程度のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列中の1～20個程度のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有するペプチド、

(4) 配列番号：6で表わされるアミノ酸配列中の1～10個程度のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：6で表わされるアミノ酸配列に1～20個程度のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、または配列番号：6で表わされるアミノ

酸配列中の1～20個程度のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有するペプチドなどが用いられる。

【0013】

さらに、これらのムテインとしては、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-OH$ 、 $-COOH$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本明細書におけるペプチドおよびその前駆体は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをはじめとする、本発明のペプチドおよびその前駆体は、C末端が通常カルボキシル基（ $-COOH$ ）またはカルボキシレート（ $-COO^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-CONH_2$ ）またはエステル（ $-COOR$ ）であってもよい。

ここでエステル基のRとしては、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピルもしくは n -ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、 C_{3-8} シクロアルキル（例、シクロペンチル、シクロヘキシル）などのシクロアルキル基、 C_{6-12} アリール基（例、フェニル、 α -ナフチル）などのアリール基、 C_{7-14} アラルキル基（例、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル、もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル）などのアラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルエステルなどが用いられる。

本発明のペプチドまたはその前駆体がC末端以外にカルボキシル基またはカルボキシレートを有している場合、それらの基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この時のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

本発明のペプチドまたは前駆体の塩としては、とりわけ生理学的に許容される

酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0014】

本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや温血動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや温血動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行い、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のペプチド、その前駆体またはそれらのアミド体の合成には、通常市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えばクロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のペプチド、その前駆体またはそれらのアミド体を取得する。

【0015】

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン、クロロホルム、トリフルオロエタノール、ジメチルスルホキシド、DMF、ジメチルスルホキシド、ピリジン、クロロホルム、ジオキサン、塩化メチレン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、酢酸エチル、N-メチルピロリドンあるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーアミルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタリル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。カルボキシル基の保護基としては、例えばアルキルエステル（たとえば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどのエステル基）、ベンジルエステル、4-ニトロベン

ジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル、フェナシンエステル、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリープトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが用いられる。

【0016】

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えばアセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭素から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリープチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、BrZ、ターシャリープチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオア

ニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0017】

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

ペプチドまたはその前駆体のアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、 α -アミノ基の保護基を除いたカルボキシル末端側ペプチドと所望ペプチドからカルボキシル末端側を除いたアミノ末端側ペプチドの α -カルボキシル基の保護基のみを除去し、 α -アミノ基や側鎖官能基に上記したような適当な保護基を付けた保護ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチドを得ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のペプチドまたはその前駆体のアミド体を得ることができる。

ペプチドまたはその前駆体のエステル体を得るには、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ペプチドまたはその前駆体のアミド体と同様にして、所望のペプチドまたはその前駆体のエステル体を得ることができる。

【0018】

また、本発明の前駆体が切断され成熟体である本発明のペプチドが生成される際に生じるペプチド断片またはその塩も、生理学上、有用なペプチドである。こ

のようなペプチド断片としては、例えば、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15または配列番号：16で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。これらペプチド断片の塩としては、上記した本発明のペプチド等の塩と同様のものが用いられる。

これらペプチド断片またはそれらの塩は、前述した本発明の前駆体を適当なペプチダーゼを用いて切断することによって製造することもできるし、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

これらペプチド断片またはそれらの塩は、例えば、本発明の前駆体に対する抗体を製造する際に用いる抗原として有用である。また、生体内における本発明のペプチドの生成機構の解明にも重要である。

【0019】

本発明のペプチドまたは前駆体をコードするDNAとしては、前述した本発明のペプチドまたは前駆体をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：7で表わされる塩基配列を有するDNAにハイブリダイズし、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドと同一の活性、すなわち、ソマトスタチン様活性またはコルチスタチン様活性を有するペプチドをコードするDNAであれば何れのものでもよい。ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：7で表わされる塩基配列と約90%以上、好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチド

をコードするDNAとしては、配列番号：7で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。また、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を含有する本発明のペプチドの欠失型ムテインをコードするDNAとしては、配列番号：8で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。ただし、配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を有するラットコルチスタチンをコードする塩基配列を含有するDNAを除く。

【0020】

本発明の配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を有する本発明の前駆体ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：9で表わされる塩基配列を有するDNAにハイブリダイズし、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドと同一の活性、すなわち、ソマトスタチン様活性またはコルチスタチン様活性を有する前駆体ペプチドをコードするDNAであれば何れのものでよい。ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：9で表わされる塩基配列と約80%以上、好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

より具体的には、配列番号：3のアミノ酸配列を含有する前駆体ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：9で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

本発明の配列番号：4で表わされるアミノ酸配列を有する前駆体ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：10で表わされる塩基配列を有するDNAにハイブリダイズし、配列番号：4で表わされるアミノ酸配列を有する前駆体ペプチドと同一の活性、すなわち、ソマトスタチン様活性またはコルチスタチン様活性を有する前駆体ペプチドをコードするDNAであれば何れのものでよい。ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：10で表わされる塩基配列と約80%以上、好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

より具体的には、配列番号：4のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：10で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

【0021】

本発明の配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を有する前駆体ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：11で表わされる塩基配列を有するDNAにハイブリダイズし、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を有する前駆体ペプチドと同一の活性、すなわち、ソマトスタチン様活性またはコルチスタチン様活性を有する前駆体ペプチドをコードするDNAであれば何れのものでよい。ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：11で表わされる塩基配列と約80%以上、好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

より具体的には、配列番号：5のアミノ酸配列を含有する前駆体ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：11で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

本発明の配列番号：6で表わされるアミノ酸配列を有する前駆体ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：12で表わされる塩基配列を有するDNAにハイブリダイズし、配列番号：6で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドと同一の活性、すなわち、ソマトスタチン様活性またはコルチスタチン様活性を有する前駆体ペプチドをコードするDNAであれば何れのものでよい。ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：12で表わされる塩基配列と約80%以上、好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

より具体的には、配列番号：6のアミノ酸配列を含有する前駆体ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：12で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイズは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。

【0022】

上記した本発明の前駆体から成熟体ペプチドが生成される際に生ずるペプチド断片をコードするDNAとしては、前述した該ペプチド断片をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、

ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

例えば、配列番号：13で表わされるアミノ酸配列を有するペプチド断片をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：17で表わされる塩基配列を有するDNAが、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を有するペプチド断片をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：18で表わされる塩基配列を有するDNAが、配列番号：15で表わされるアミノ酸配列を有するペプチド断片をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：19で表わされる塩基配列を有するDNAが、配列番号：16で表わされるアミノ酸配列を有するペプチド断片をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：20で表わされる塩基配列を有するDNAが用いられる。

【0023】

【発明の実施の形態】

本発明のペプチドまたは前駆体をコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のペプチドまたは前駆体をコードするDNAの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて、PCR法によって前記DNAライブラリー等から目的とするDNAを増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のペプチドまたは前駆体の一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molecular Cloning 2nd (ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。

クローン化された本発明のペプチドまたは前駆体をコードするDNAは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のペプチドまたは前駆体をコードするDNAの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のペプチドまたは前駆体をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0024】

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。

【0025】

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子[メソトレキセート(MTX)耐性]、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp^rと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺

伝子（以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO (dhfr⁻) 細胞を用いてDHFR遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ペプチドまたは前駆体のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、アルカリフォスファターゼ・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイテイングファクター α ・シグナル配列、インベルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のペプチドまたは前駆体をコードするDNAを含有するベクターを細胞に導入することによって形質転換体を製造することができる。

【0026】

宿主としては、例えばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌、バチルス属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクイレック・アシッツ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えばバチルス・サチルス (Bacillus subtilis) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・

オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984))などが用いられる。

酵母としては、例えばサッカロマイセス セレビシエ (*Saccaromyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12などが用いられる。

昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]〕。

【0027】

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Ver o細胞, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻) 細胞と略記), L細胞, ミエローマ細胞, ヒトFL細胞, 293細胞, C127細胞, BALB3T3細胞, Sp-2/O細胞などが用いられる。これらの中でも、CHO細胞、CHO (dhfr⁻) 細胞、293細胞などが好ましい。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なわれる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なわれる。

酵母を形質転換するには、例えばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)に記載の方法に従って行なわれる。

昆虫細胞を形質転換するには、例えばバイオ/テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なわれる。

動物細胞を形質転換するには、例えばヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なわれる。

【0028】

発現ベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 [Graham, F. L. and van der Eb, A. J. ヴィロロジー (Virology) 52, 456-467 (1973)]、電気穿孔法 [Niemann, E. et al. エンボ・ジャーナル (EMBO J.) 1, 841-845 (1982)] 等が挙げられる。

このようにして、本発明のペプチドまたは前駆体をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

なお、動物細胞を用いて、本発明のペプチドまたは前駆体を安定に発現させる方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細胞をクローン選択によって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マーカーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しクローン選択を行なうことにより本発明のペプチドまたは前駆体の高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることができる。また、d h f r 遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、d h f r 遺伝子とともに、本発明のペプチドまたは前駆体をコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることもできる。

上記の形質転換体を本発明のペプチドまたは前駆体をコードするDNAが発現可能な条件下で培養し、本発明のペプチドまたは前駆体を生成、蓄積せしめることによって、本発明のペプチドまたは前駆体またはその塩を製造することができる。

【0029】

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム

などが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば3β-インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

【0030】

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えばバークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 5

01(1952)], DMEM培地〔ウイルス学 (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

特に、CHO (dhfr⁻) 細胞およびdhfr 遺伝子を選択マーカーとして用いる場合、チミジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含むDMEM培地を用いるのが好ましい。

【0031】

上記培養物から本発明のペプチドまたは前駆体を分離精製するには、例えば下記の方法により行なうことができる。

本発明のペプチドまたは前駆体を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により本発明のペプチドまたは前駆体の粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、トリトンX-100（登録商標。以下、TMと略称する場合がある）などの界面活性剤が含まれていてもよい。

培養液中にペプチドまたは前駆体が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明のペプチドまたは前駆体の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフ

ィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる本発明のペプチドまたは前駆体が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する本発明のペプチドまたは前駆体を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のペプチドまたは前駆体の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0032】

本発明のペプチドまたは前駆体の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のペプチドまたは前駆体を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のペプチドまたは前駆体を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、ペプチドまたは前駆体の化学

IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のペプチドまたは前駆体を精製単離することができる。上記方法で得られるペプチドまたは前駆体が遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0033】

本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩に対する抗体は、本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩（以下、本発明のペプチド等と略記する）に対する抗体は、本発明のペプチド等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のペプチド等は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化ペプチド等と抗血清とを反

応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えばNS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000~PEG6000）が10~80%程度の濃度で添加され、20~40℃、好ましくは30~37℃で1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0034】

抗ペプチド等抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ペプチド等抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した抗ペプチド等抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したペプチド等を加え、固相に結合した抗ペプチド等モノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

抗ペプチド等モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なわれる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約3

7℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なわれる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗ペプチド等抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクローナル抗体の精製

抗ペプチド等モノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行われる。

【0035】

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のペプチド等に対するポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。

例えば、免疫抗原（ペプチド等抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のペプチド等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全

フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取される。

抗血清中の抗ペプチド等抗体価の測定は、上記ハイブリドーマ培養上清の抗体価の測定と同様にして測定できる。抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なわれる。

【0036】

本発明のDNAに相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAとしては、本発明のDNAに相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAの全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの全塩基配列うち、本発明のペプチド等のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

【0037】

本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩は、例えば、ソマトスタチ様活性、コルスタチン様活性などの有用な生理活性を有しているペプチドである。具体的には、（1）成長ホルモンの分泌抑制作用、（2）甲状腺刺激ホルモン、プロラクチンなどの下垂体ホルモンの分泌抑制作用、（3）ガストリン、インシュリンなどの消化管ホルモンの分泌抑制作用、（4）神経伝達作用、（5）細胞増殖作用、（6）レム睡眠の誘発物質であるアセチルコリン作用の抑制作用などを有している。したがって、本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩はさまざまな用途に用いることができる。

以下に、本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩、本発明のDNA、

本発明の抗体、本発明のスクリーニング方法、本発明のスクリーニング用キットおよびアンチセンスDNAの用途を説明する。

【0038】

(1) 各種疾病の治療・予防剤などの医薬

本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩は、上記したとおり、(1) 成長ホルモンの分泌抑制作用、(2) 甲状腺刺激ホルモン、プロラクチンなどの下垂体ホルモンの分泌要請作用、(3) ガストリン、インシュリンなどの消化管ホルモンの分泌抑制作用、(4) 神経伝達作用、(5) 細胞増殖作用、(6) レム睡眠の誘発物質であるアセチルコリン作用の抑制作用などを有している。

したがって、本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩は、例えば、ホルモン産生腫瘍、先端巨大症、巨人症、痴呆症、糖尿病、胃潰瘍などの治療・予防剤、ホルモン分泌抑制剤、腫瘍増殖抑制剤、神経活動もしくは睡眠の調節剤などの医薬として有用である。さらには、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性肺炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性肺炎、肝硬変、大腸がん(結腸/直腸がん)、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病(I型)、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病(II型)、非小細胞肺がん、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症(骨粗鬆症の予防)、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺がん、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核

、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、神経変成疾患等の治療・予防剤などの医薬として有用である。

【0039】

また、本発明のペプチドまたはその前駆体をコードするDNAは、ホルモン産生腫瘍、先端巨大症、巨人症、痴呆症、糖尿病、胃潰瘍などの遺伝子治療・予防剤、ホルモン分泌抑制剤、腫瘍増殖抑制剤、神経活動もしくは睡眠の調節剤などの医薬として有用であり、さらには、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性肺炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性肺炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ状球菌感染症、悪性黒色腫、転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症（骨粗鬆症の予防）、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、神経変成疾患等の遺伝子治療・予防剤などの医薬として有用である。

【0040】

本発明の本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩、またはこれらをコードするDNAを上記の医薬として使用する場合は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口

的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のペプチドあるいはDNAを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。本発明のDNAを用いる場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのようない賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのようない甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのようない香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のようない液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようないベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのようない天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整さ

れた注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

【0041】

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該DNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象組織、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0042】

(2) 遺伝子診断剤

本発明のペプチドまたはその前駆体をコードするDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明のペプチドまたはその前駆体をコードするDNAの異常（遺伝子異常）を検出することができる。すなわち、本発明のDNAは、例えば、ホルモン産生腫瘍、先端巨大症、巨人症、痴呆症、糖尿病、胃潰瘍などの他、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状

疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症（骨粗鬆症の予防）、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、神経変成疾患などの疾病の遺伝子診断剤として有用である。

【0043】

（3）本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩の定量

本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩に対する抗体は、本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩（以下、本発明のペプチド等と略記する）を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のペプチド等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

（i）本発明のペプチド等に対する抗体と、被検液および標識化された本発明のペプチド等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のペプチド等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のペプチド等の定量法、および

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のペプチド等の定量法を提供する。

上記（ii）の定量法においては、一方の抗体が本発明のペプチド等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のペプチド等のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

【0044】

また、本発明のペプチド等に対するモノクローナル抗体（以下、抗ペプチド抗体と称する場合がある）を用いて本発明のペプチド等の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab')_2$ 、 Fab' 、あるいは Fab 画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のペプチド等の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、ペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられる。放射性同位元素としては、例えば $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが、発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0045】

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常ペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した抗ペプチド抗体に被検液を反応させ（1

次反応)、さらに標識化抗ペプチド抗体を反応させ(2次反応)たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のペプチド量等を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のペプチド等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる抗ペプチド抗体は、本発明のペプチド等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のペプチド等のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0045】

本発明のペプチド抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0046】

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のペプチド等の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明のペプチド抗体を用いることによって、本発明のペプチド等を感度良く定量することができる。

【0047】

さらには、本発明の抗ペプチド抗体を用いて本発明のペプチド等の濃度を定量することによって、例えば、ホルモン産生腫瘍、先端巨大症、巨人症、痴呆症、糖尿病、胃潰瘍、ホルモン過剰分泌、腫瘍増殖、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎

、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性脾炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症（骨粗鬆症の予防）、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、神経変成疾患などの各種疾病の診断を行なうことができる。

【0048】

（4）医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩（以下、本発明のペプチド等と略称する）は、ソマトスタチンレセプター、コルチスタチンレセプター、本発明のペプチド等に対するレセプター、GPR7またはGPR8（以下、レセプターと略称する）に特異的に結合することができるので、本発明のペプチド等と該レセプターを用いたリガンド・レセプター結合アッセイ系を構築することによって、ソマトスタチン様活性またはコルチスタチン様活性を有する医薬候補化合物のスクリーニングや、本発明のペプチド等、ソマトスタチンもしくはコルチスタチンの作用を抑制する医薬候補化合物のスクリーニングを行なうことができる。すなわち、本発明は、本発明のペプチド等を用いるレセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

より具体的には、本発明は、

(1) (i) レセプターまたはその部分ペプチドに、本発明のペプチド等を接触させた場合と (ii) レセプターまたはその部分ペプチドに、本発明のペプチド等および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするレセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、および

(2) (i) レセプターを含有する細胞またはその細胞膜画分に、本発明のペプチド等を接触させた場合と (ii) レセプターを含有する細胞またはその細胞膜画分に、本発明のペプチド等および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするレセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

具体的には、本発明のスクリーニング方法においては、(i) と (ii) の場合における、例えばレセプターまたはレセプターを含有する細胞に対する本発明のペプチド等の結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とするものである。

【0049】

より具体的には、本発明は、

(1 a) (i) 標識した本発明のペプチド等を、レセプターまたはその部分ペプチドに接触させた場合と、(ii) 標識した本発明のペプチド等および試験化合物を、レセプターまたはその部分ペプチドに接触させた場合における、標識した本発明のペプチド等の該レセプターまたはその部分ペプチドまたはそれらの塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするレセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、

(2 a) (i) 標識した本発明のペプチド等を、レセプターを含有する細胞またはその細胞膜画分に接触させた場合と、(ii) 標識した本発明のペプチド等および試験化合物を、レセプターを含有する細胞またはその細胞膜画分に接触させた場合における、標識した本発明のペプチド等の該細胞またはその細胞膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするレセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、および

(2 b) (i) 本発明のペプチド等を、レセプターを含有する細胞またはその細

胞膜画分に接触させた場合と、(ii) 本発明のペプチドおよび試験化合物を、レセプターを含有する細胞またはその細胞膜画分に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、細胞の遊走活性などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするレセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

【0050】

上記の(1a)または(2a)のスクリーニング方法において、レセプターに結合して、本発明のペプチド等とレセプターとの結合を阻害する化合物がレセプターアゴニストまたはアンタゴニストとして選択できる。

上記(2b)のスクリーニング方法において、レセプターに結合し、該レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、細胞の遊走活性などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物をレセプターアゴニストとして選択することができ、一方、細胞刺激活性を阻害する作用を有する化合物をレセプターアンタゴニストとして選択することができる。

また、上記の(1a)または(2a)のスクリーニング方法において、本発明のペプチド等とレセプターとの結合を阻害する活性が認められた試験化合物の中で、該細胞刺激活性を有する化合物をレセプターアゴニストとして選択することができ、該細胞刺激活性を有しない化合物をレセプターアンタゴニストとして選択することができる。

【0051】

本発明のスクリーニング方法に用いられるレセプターのうち、ソマトスタチンレセプターとしては、例えば、ソマトスタチンレセプターサブタイプ1 (SSTR1) もしくはサブタイプ2 (SSTR2) [山田ら、プロシーディング・オブ・

ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci., USA)、89巻、251-255頁、1992年]、サブタイプ3 (SSTR3) [SSTR3; 山田ら、モレキュラー・エンドクリノロジー (Molecular Endocrinology)、6巻、2136-2142頁、1992年]、サブタイプ4 (SSTR4) もしくはサブタイプ5 (SSTR5) [山田ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 195巻、844-852頁、1993年] などを用いることができる。GPR7またはGPR8としては、ゲノミックス (Genomics)、28,84-91(1995)に記載のものを用いることができる。コルチスタチンレセプターまたは本発明のペプチド等に対するレセプターは自体公知のタンパク質の精製方法に従って入手することができるし、また、自体公知の遺伝子工学的手法に従って該レセプターをコードするDNAをクローニングした後、前記した本発明のペプチド等の発現方法に従って目的とするレセプターを入手することもできる。

該レセプターの部分ペプチドとしては、全長レセプターを適当に切断して得られる部分ペプチドを用いることができる。

【0052】

レセプターを含有する細胞としては、前記した本発明のペプチド等を発現させるために用いる宿主細胞として列記したものと同様のものを用いることができるが、なかでも、CHO細胞などが好ましい。レセプターを含有する細胞は、レセプターをコードするDNAを用いて、自体公知の方法、例えば、前記した本発明のペプチドの発現方法などに従って製造することができる。レセプターをコードするDNAは、自体公知の遺伝子工学的手法に従って入手することができるが、例えばソマトスタチンレセプターサブタイプ1~5、GPR7またはGPR8は、上記の文献に従って入手することができる。

本発明のスクリーニング方法において、レセプターを含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化することができる。固定化方法は、それ自体公知の方法に従って行うことができる。また、レセプターを含有する組織として、各種動物の脳、下垂体、肺等またはそれらの膜画分を用いることができる。

標識した本発明のペプチド等としては、例えば、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識した本発明のペプチド等などを用いることができる。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0053】

具体的には、上記の(1a)または(2a)のスクリーニング方法を実施するには、まず、本発明のレセプターを含有する細胞またはその細胞膜画分、あるいはレセプターまたはその部分ペプチドを、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH約4~10(望ましくは、pH約6~8)のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどの、本発明のペプチド等とレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM(花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的で、PMSF、ロイペプチン、バシトラシン、アプロチニン、E-64(ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。一方、細胞が固定化細胞の場合、培養器に固定化させたまま、つまり細胞を生育させた状態で、あるいはグルタルアルデヒドやパラホルムアルデヒドで固定した細胞を用いて、本発明のペプチド等とレセプターを結合させることができる。

【0054】

この場合、該緩衝液は培地やハンクス液などが用いられる。そして、0.01 ml~10 mlの該レセプター溶液に、一定量(例えば、2000 Ci/mmoleの場合、約10000 cpm~1000000 cpm)の標識した本発明のペプチド等(例えば、 $[^{125}\text{I}]$ で標識した本発明のペプチド等)を添加し、同時に 10^{-4}M ~ 10^{-10}M の試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識の本発明のペプチド等を加えた反応チューブも用意

する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性（例えば、 $[^{125}\text{I}]$ の量）を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで測定する。濾過には、マニホールドやセルハーベスターを用いることができるが、セルハーベスターを用いることが効率を上げるために望ましい。拮抗する物質がない場合のカウント(B_0)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント($B_0 - \text{NSB}$)を100%とした時、特異的結合量($B - \text{NSB}$)が、例えばカウント($B_0 - \text{NSB}$)の50%以下になる試験化合物をアゴニストまたはアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0055】

また、上記(2b)のスクリーニング方法を実施するためには、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、細胞の遊走活性などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、レセプターを含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

【0056】

本発明のスクリーニング用キットは、本発明のペプチド等、好ましくはさらに、レセプターを含有する細胞またはその細胞膜画分、あるいはレセプターまたは

その部分ペプチドを含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

〔スクリーニング用試薬〕

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②ソマトスタチンレセプター標品

ソマトスタチンレセプターを含有するCHO細胞を、12穴プレートに5×10⁵個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識した本発明のペプチド等

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] などて標識した本発明のペプチド等

溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μ Mに希釈する。

④本発明のペプチド等標準液

本発明のペプチド等を0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで0.1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

【0057】

〔測定法〕

①12穴組織培養用プレートにて培養した組換え型ソマトスタチンレセプターを含有するCHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

②10⁻³~10⁻¹⁰Mの試験化合物溶液を5 μ l加えた後、5nMの標識した本発明のペプチド等を5 μ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに10⁻⁴Mの本発明のペプチド等を5 μ l加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識

した本発明のペプチド等を0.5mlの0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。なお、 $[^{125}\text{I}]$ で標識されている場合は、液体シンチレーターと混合することなしに直接ガンマカウンターで測定できる。

【0058】

【数1】

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B_0 : 最大結合量

【0059】

以上のとおり、本発明のペプチド等はレセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするための試薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のペプチド等とレセプターとの結合を阻害する化合物であり、具体的には、レセプターを介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆる、レセプターアゴニスト）、あるいは該細胞刺激活性を有しない化合物またはその塩（いわゆる、レセプターアンタゴニスト）である。

レセプターアゴニストは、本発明のペプチド等あるいはソマトスタチンが有する生理活性の全部または一部を有しているので、該生理活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。例えば、成長ホルモン、下垂体ホルモン（例えば、甲状腺刺激ホルモン、プロラクチンなど）、消化管ホルモン（例えば、ガストリン、インシュリンなど）などのホルモンの分泌抑制剤などとして有用であり、さらにはホルモン産生腫瘍、先端巨大症、巨人症、痴呆症、糖尿病、胃潰瘍などの

治療・予防治療剤、ホルモン分泌抑制剤、腫瘍増殖抑制剤、神経活動もしくは睡眠の調節剤などとして有用である。

一方、レセプターアンタゴニストは、本発明のペプチド等あるいはソマトスタチンが有する生理活性の全部または一部を抑制することができるので、該生理活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。例えば、成長ホルモン、下垂体ホルモン（例えば、甲状腺刺激ホルモン、プロラクチンなど）、消化管ホルモン（例えば、ガストリン、インシュリンなど）などのホルモンの分泌促進剤などとして有用であり、さらには小人症、乳汁分泌不全、糖尿病などの治療・予防剤、あるいは消化管諸臓器の機能調節剤（例えば、胃、小腸、脾臓、肝臓などの臓器の機能調節剤）などとして有用である。

【0060】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出

植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

【0061】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトまたは温血哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0062】

（4）アンチセンスDNA

前記のとおり、本発明のペプチド等は、(1) 成長ホルモンの分泌抑制作用、(2) 甲状腺刺激ホルモン、プロラクチンなどの下垂体ホルモンの分泌抑制作用、(3) ガストリン、インシュリンなどの消化管ホルモンの分泌抑制作用、(4) 神経伝達作用、(5) 細胞増殖作用、(6) レム睡眠の誘発物質であるアセチルコリン作用の抑制作用などを有している。したがって、本発明のDNAに相補的に結合し、本発明のDNAもしくは本発明のペプチド等の発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、生体内において上記の作用を発揮する本発明のペプチド等またはそれらをコードするDNAの機能を抑制することができるので、例えば、成長ホルモン、下垂体ホルモン（例えば、甲状腺刺激ホルモン、プロラクチンなど）、消化管ホルモン（例えば、ガストリン、インシュリンなど）などのホルモンの分泌促進剤などとして有用であり、さらには小人症、乳汁分泌不全、糖尿病などの治療・予防剤、あるいは消化管諸臓器の機能調節剤（例えば、胃、小腸、脾臓、肝臓などの臓器の機能調節剤）などとして使用することができる。アンチセンスDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合、前記した本発明のペプチドまたはDNAを含有する各種疾病の治療・予防剤と同様にして実施することができる。

【0063】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸

mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
EIA	: エンザイムイムノアッセイ

【0064】

Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン

G l n	: グルタミン
p G l u	: ピログルタミン酸
M e	: メチル基
E t	: エチル基
B u	: ブチル基
P h	: フェニル基
T C	: チアソリジン-4 (R) -カルボキサミド基

【0065】

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

B H A	: ベンズヒドリルアミン
p M B H A	: p-メチルベンズヒドリルアミン
T o s	: p-トルエンスルフォニル
C H O	: ホルミル
O c H e x	: シクロヘキシルエステル
B z l	: ベンジル
B o m	: ベンジルオキシメチル
B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
B o c	: t-ブチルオキシカルボニル
D C M	: ジクロロメタン
H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
D C C	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
T F A	: トリフルオロ酢酸
D I E A	: ジイソプロピルエチルアミン

【0066】

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

図2のアミノ酸配列の第89番目～105番目のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

図2のアミノ酸配列の第91番目～105番目のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：3〕

図2のアミノ酸配列の第77番目～105番目のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4〕

図2のアミノ酸配列の第44番目～105番目のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：5〕

図2のアミノ酸配列の第21番目～105番目のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：6〕

図2のアミノ酸配列の第1番目～105番目のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：7〕

図2の塩基配列の268番目～318番目の塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

図2の塩基配列の274番目～318番目の塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕

図2の塩基配列の232番目～318番目の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

図2の塩基配列の133番目～318番目の塩基配列を示す。

〔0067〕

〔配列番号：11〕

図2の塩基配列の64番目～318番目の塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

図2の塩基配列の4番目～318番目の塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

図2のアミノ酸配列の第77番目～88番目のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：14〕

図2のアミノ酸配列の第44番目～76番目のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：15〕

図2のアミノ酸配列の第21番目～43番目のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：16〕

図2のアミノ酸配列の第1番目～20番目のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：17〕

図2の塩基配列の232番目～267番目の塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

図2の塩基配列の133番目～231番目の塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

図2の塩基配列の64番目～132番目の塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

図2の塩基配列の4番目～63番目の塩基配列を示す。

〔0068〕

〔配列番号：21〕

図2のアミノ酸配列の第1番目～88番目のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：22〕

公知のラット由来コルチスタチンのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：23〕

公知のラット由来ソマトスタチンのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：24〕

本発明のDNAをクローニングするために使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

本発明のDNAをクローニングするために使用したプライマーの塩基配列を示す。

後述の実施例2で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/p hCSP6は、平成8年6月6日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERM BP-5564として、平成8年6月5日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 15967として寄託されている。

【0069】

【実施例】

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法はモレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

【0070】

【実施例1】 ヒト脳 poly(A)⁺RNA画分からのcDNAの合成とRT-PCR法による生理活性ペプチドcDNAの増幅

クローンテック社より購入したヒト脳 poly(A)⁺RNA画分5 μ gにプライマーとしてランダムDNAヘキサマー (BRL社) を加え、モロニ Maus 白血病ウイルスの逆転写酵素 (BRL社) により、添付バッファーを用いて相補DNAを合成した。反応後の産物はフェノール：クロロホルム (1:1) で抽出し、エタノール沈殿を行った後、30 μ lのTEに溶解した。調製したcDNA 1 μ lを鋳型として、次の2つのプライマーを用いて、PCRによる増幅を行なった。

5'-ACAAGATGCCATTGTCCCCCGGCCTCCT-3'

(配列番号：24)

5'-TTCAGGTCTGTAAATTA AACTTGCGTGA-3'

(配列番号：25)

反応液の組成は、合成DNAプライマー (5'プライマー配列および3'プライマー配列) 各20 pM、0.25 mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase 0.5 μ lおよび酵素に付属のバッファー10 μ lで、総反応溶液量は100 μ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキン・エルマー社) を用い、95℃・30秒、65℃・1分、72℃・30秒のサイクルを35回繰り返した。増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行なった。

【0071】

【実施例2】 PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解読による新規生理活性ペプチド候補クローンの選択

実施例1で行ったPCR後の反応産物は1.2%のアガロースゲルを用いて分離し、バンドの部分のカミソリで切り出した後、SUPRECOI™ (タカラ)、フェノール抽出、エタノール沈殿を行なってDNAを回収した。TAクローニングキット (インビトロゲン社) の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR™ IIへサブクローニングした。これを大腸菌JM109 competent cell (宝酒造株式会社) に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離し、形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/p hCSP6を得た。

個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置 (クラボウ) を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてEcoRIによる切断を行ない、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。残りのDNAの一部をさらにRNase処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られた塩基配列の情報は、DNASIS (日立システムエンジニアリング社) を用いて行なった。決定した塩基配列を〔図1〕に示した。

決定した塩基配列〔図1〕をもとにホモロジー検索を行った結果、形質転換体E. coli JM109/p hCSP6の保有するプラスミドに挿入されたcDNA断片は、新規生理活性ペプチドをコードすることが分かった。さらに、それを確認するために、DNASIS (日立システムエンジニアリング社) を用い、塩基配列をアミノ酸配列に変換後〔図2〕、疎水性プロット〔図3〕およびアミノ酸配列に基づくホモロジー検索を行い、ラットコルチスタチン (U51919)、ラットソマトスタチン (J00788) との相同性を見いだした〔図4〕。

上記の () 内の略語は、NBRF-PIRにデータとして登録される際の整理番号であり、通常Accession Numberと呼ばれるものである。

【0072】

【発明の効果】

本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩は、（１）成長ホルモンの分泌抑制作用、（２）甲状腺刺激ホルモン、プロラクチンなどの下垂体ホルモンの分泌抑制作用、（３）ガストリン、インシュリンなどの消化管ホルモンの分泌抑制作用、（４）神経伝達作用、（５）細胞増殖作用、（６）レム睡眠の誘発物質であるアセチルコリン作用の抑制作用などのソマトスタチ様活性もしくはコルスタチン様活性を有している。したがって、本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩は、例えば、ホルモン産生腫瘍、先端巨大症、巨人症、痴呆症、糖尿病、胃潰瘍などの治療・予防剤、ホルモン分泌抑制剤、腫瘍増殖抑制剤、神経活動もしくは睡眠の調節剤などの医薬として有用である。

本発明のペプチドまたはその前駆体をコードするDNAは、例えば、ホルモン産生腫瘍、先端巨大症、巨人症、痴呆症、糖尿病、胃潰瘍などの遺伝子治療・予防剤、ホルモン分泌抑制剤、腫瘍増殖抑制剤、神経活動もしくは睡眠の調節剤などの医薬として有用である。さらに、本発明のDNAは、例えば、ホルモン産生腫瘍、先端巨大症、巨人症、痴呆症、糖尿病、胃潰瘍などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩に対する抗体は、本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のペプチド等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

さらに、本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩は、レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするための試薬として有用である。

【0073】

【配列表】

【配列番号：1】

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Arg Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys

1 5 10 15

Lys

【0074】

【配列番号：2】

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys

1 5 10 15

【0075】

【配列番号：3】

配列の長さ：29

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gln Glu Gly Ala Pro Pro Gln Gln Ser Ala Arg Arg Asp Arg Met Pro

1 5 10 15

Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys

20 25

【0076】

【配列番号：4】

配列の長さ：62

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Ser Leu Leu Thr Phe Leu Ala Trp Trp Phe Glu Trp Thr Ser Gln

1 5 10 15

Ala Ser Ala Gly Pro Leu Ile Gly Glu Glu Ala Arg Glu Val Ala Arg

20 25 30

Arg Gln Glu Gly Ala Pro Pro Gln Gln Ser Ala Arg Arg Asp Arg Met

35 40 45

Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys

50 55 60

【0077】

【配列番号：5】

配列の長さ：85

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Leu Pro Leu Glu Gly Gly Pro Thr Gly Arg Asp Ser Glu His Met Gln

1 5 10 15

Glu Ala Ala Gly Ile Arg Lys Ser Ser Leu Leu Thr Phe Leu Ala Trp

20 25 30

Trp Phe Glu Trp Thr Ser Gln Ala Ser Ala Gly Pro Leu Ile Gly Glu

35 40 45

Glu Ala Arg Glu Val Ala Arg Arg Gln Glu Gly Ala Pr Pro Gln Gln

50 55 60

Ser Ala Arg Arg Asp Arg Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr

65 70 75 80

Phe Ser Ser Cys Lys

85

【0078】

【配列番号：6】

配列の長さ：105

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Pro Leu Ser Pro Gly Leu Leu Leu Leu Leu Ser Gly Ala Thr

1 5 10 15

Ala Thr Ala Ala Leu Pro Leu Glu Gly Gly Pro Thr Gly Arg Asp Ser

20 25 30

Glu His Met Gln Glu Ala Ala Gly Ile Arg Lys Ser Ser Leu Leu Thr

35 40 45

Phe Leu Ala Trp Trp Phe Glu Trp Thr Ser Gln Ala Ser Ala Gly Pro

50 55 60

Leu Ile Gly Glu Glu Ala Arg Glu Val Ala Arg Arg Gln Glu Gly Ala

65 70 75 80

Pro Pro Gln Gln Ser Ala Arg Arg Asp Arg Met Pro Cys Arg Asn Phe

85 90 95

Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys

100 105

【0079】

【配列番号：7】

配列の長さ：51

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

GACAGAATGC CCTGCAGGAA CTTCTTCTGG AAGACCTTCT CCTCCTGCAA A

51

【0080】

【配列番号：8】

配列の長さ：45

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

ATGCCCTGCA GGAAGTTCTT CTGGAAGACC TTCTCCTCCT GCAAA

45

【0081】

【配列番号：9】

配列の長さ：87

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

CAGGAAGGCG CACCCCCCA GCAATCCGCG CGCCGGGACA GAATGCCCTG CAGGAACTTC

60

TTCTGGAAGA CCTTCTCCTC CTGCAAA

87

【0082】

【配列番号：10】

配列の長さ：

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

AGCAGCCTCC TGACTTTCCT CGCTTGGTGG TTTGAGTGGA CCTCCCAGGC CAGTGCCGGG	60
CCCCTCATAG GAGAGGAAGC TCGGGAGGTG GCCAGGCGGC AGGAAGGCGC ACCCCCCCAG	120
CAATCCGCGC GCCGGGACAG AATGCCCTGC AGGAACTTCT TCTGGAAGAC CTTCTCCTCC	180
TGCAAA	186

【0083】

【配列番号：11】

配列の長さ：255

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

CTGCCCCTGG AGGGTGGCCC CACCGGCCGA GACAGCGAGC ATATGCAGGA AGCGGCAGGA	60
ATAAGGAAAA GCAGCCTCCT GACTTTCCTC GCTTGGTGGT TTGAGTGGAC CTCCCAGGCC	120
AGTGCCGGGC CCCTCATAGG AGAGGAAGCT CGGGAGGTGG CCAGGCGGCA GGAAGGCGCA	180
CCCCCCCAGC AATCCGCGCG CCGGGACAGA ATGCCCTGCA GGAACCTTCTT CTGGAAGACC	240
TTCTCCTCCT GCAAA	255

【0084】

【配列番号：12】

配列の長さ：315

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

```

ATGCCATTGT CCCCCGGCCT CCTGCTGCTG CTGCTCTCCG GGGCCACGGC CACCGCTGCC    60
CTGCCCCTGG AGGGTGGCCC CACCGGCCGA GACAGCGAGC ATATGCAGGA AGCGGCAGGA    120
ATAAGGAAAA GCAGCCTCCT GACTTTCCTC GCTTGGTGGT TTGAGTGGAC CTCCCAGGCC    180
AGTGCCGGGC CCCTCATAGG AGAGGAAGCT CGGGAGGTGG CCAGGCGGCA GGAAGGCGCA    240
CCCCCCCAGC AATCCGCGCG CCGGGACAGA ATGCCCTGCA GGAAGTTCTT CTGGAAGACC    300
TTCTCCTCCT GCAAA                                         315
  
```

【0085】

【配列番号：13】

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

```

Gln Glu Gly Ala Pro Pro Gln Gln Ser Ala Arg Arg
1           5           10
  
```

【0086】

【配列番号：14】

配列の長さ：33

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

```

Ser Ser Leu Leu Thr Phe Leu Ala Trp Trp Phe Glu Trp Thr Ser Gln
1           5           10           15
Ala Ser Ala Gly Pro Leu Ile Gly Glu Glu Ala Arg Glu Val Ala Arg
                20           25           30
  
```

Arg

【0087】

【配列番号：15】

配列の長さ：23

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Leu Pro Leu Glu Gly Gly Pro Thr Gly Arg Asp Ser Glu His Met Gln

1

5

10

15

Glu Ala Ala Gly Ile Arg Lys

20

【0088】

【配列番号：16】

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Pro Leu Ser Pro Gly Leu Leu Leu Leu Leu Ser Gly Ala Thr

1

5

10

15

Ala Thr Ala Ala

20

【0089】

【配列番号：17】

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

CAGGAAGGCG CACCCCCCA GCAATCCGCG CGCCGG 36

【0090】

【配列番号：18】

配列の長さ：99

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

AGCAGCCTCC TGACTTTCCT CGCTTGGTGG TTTGAGTGA CCTCCAGGC CAGTGCCGGG 60

CCCCTCATAG GAGAGGAAGC TCGGGAGGTG GCCAGGCCG 99

【0091】

【配列番号：19】

配列の長さ：69

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

CTGCCCCTGG AGGGTGGCCC CACCGGCCGA GACAGCGAGC ATATGCAGGA AGCGGCAGGA 60

ATAAGGAAA 69

【0092】

【配列番号：20】

配列の長さ：60

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

ATGCCATTGT CCCCCGGCCT CCTGCTGCTG CTGCTCTCCG GGGCCACGGC CACCGCTGCC 60

【0093】

【配列番号：21】

配列の長さ：88

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Pro Leu Ser Pro Gly Leu Leu Leu Leu Leu Ser Gly Ala Thr

1 5 10 15

Ala Thr Ala Ala Leu Pro Leu Glu Gly Gly Pro Thr Gly Arg Asp Ser

20 25 30

Glu His Met Gln Glu Ala Ala Gly Ile Arg Lys Ser Ser Leu Leu Thr

35 40 45

Phe Leu Ala Trp Trp Phe Glu Trp Thr Ser Gln Ala Ser Ala Gly Pro

50 55 60

Leu Ile Gly Glu Glu Ala Arg Glu Val Ala Arg Arg Gln Glu Gly Ala

65 70 75 80

Pro Pro Gln Gln Ser Ala Arg Arg

85

【0094】

【配列番号：22】

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys

1 5 10 15

【0095】

【配列番号：23】

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys

1 5 10

【0096】

【配列番号：24】

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACAAGATGCC ATTGTCCCCC GGCCTCCT 28

【0097】

【配列番号：25】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TTCAGGTCTG TAATTAACT TCGTGA 27

【0098】

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2で得られた本発明のペプチドおよび前駆体をコードするDNAの塩基配列を示す。

【図2】実施例2で得られた本発明のペプチドおよび前駆体をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す。

【図3】図2に示される本発明の前駆体のアミノ酸配列の疎水性プロット分析の結果を示す。

【図4】図2に示される本発明の前駆体(phCSP6)と、ラットコルチスタチン(r cortistatin; U51919)およびラットソマトスタチン(r somatostatatin; J00788)とのアミノ酸配列を比較した結果を示す。

【書類名】 図面

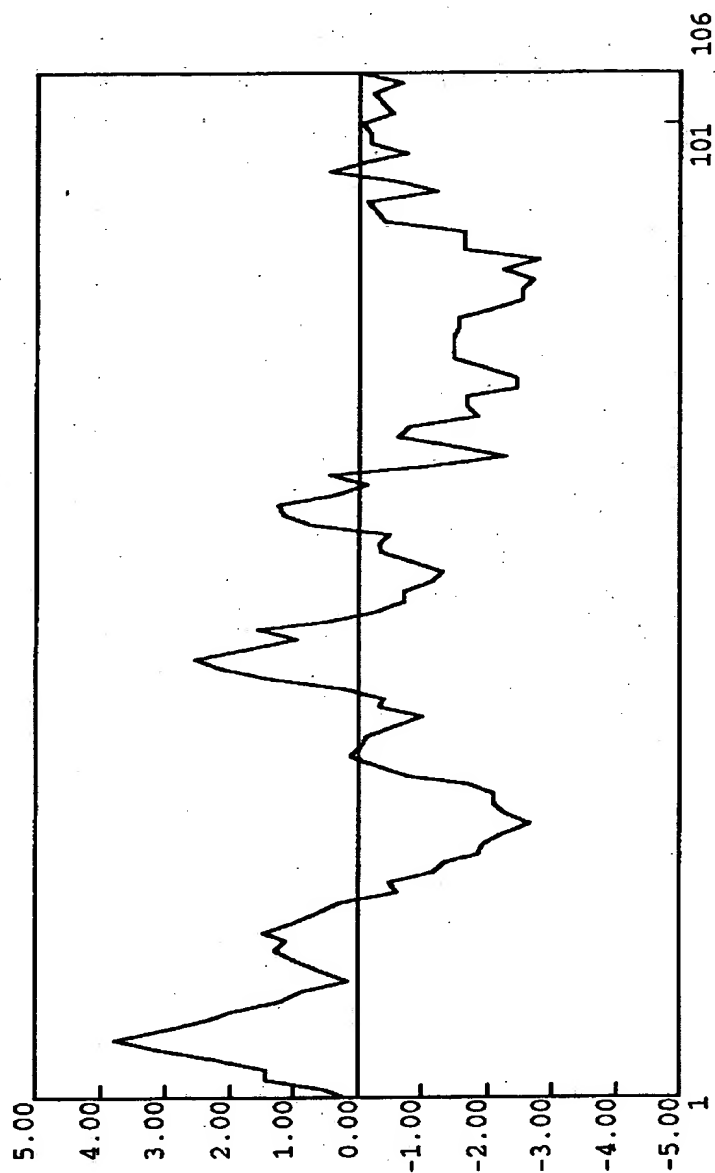
【図 1】

10	20	30	40	50	60
ACAAGATGCC	ATTGTCCCCC	GGCCTCCTGC	TGCTGCTGCT	CTCCGGGGCC	ACGGCCACCG
70	80	90	100	110	120
CTGCCCTGCC	CCTGGAGGGT	GGCCCCACCG	GCCGAGACAG	CGAGCATATG	CAGGAAGCGG
130	140	150	160	170	180
CAGGAATAAG	GAAAAGCAGC	CTCCTGACTT	TCCTCGCTTG	GTGGTTTGAG	TGGACCTCCC
190	200	210	220	230	240
AGGCCAGTGC	CGGGCCCCCTC	ATAGGAGAGG	AAGCTCGGGA	GGTGGCCAGG	CGGCAGGAAG
250	260	270	280	290	300
GCGCACCCCC	CCAGCAATCC	GCGCGCCGGG	ACAGAATGCC	CTGCAGGAAC	TTCTTCTGGA
310	320	330	340	350	360
AGACCTTCTC	CTCCTGCAAA	TAAAACCTCA	CCCATGAATG	CTCACGCAAG	TTTAATTACA
370	380	390	400	410	420
GACCTGAA..

【図 2】

3	AAGATGCCATTGTCCCCCGGCCTCCTGCTGCTGCTGCTCTCCGGGGCCACGGCCACCGCT	62
1	MetProLeuSerProGlyLeuLeuLeuLeuLeuSerGlyAlaThrAlaThrAla	19
63	GCCCTGCCCCCTGGAGGGTGGCCCCACCGGCCGAGACAGCGAGCATATGCAGGAAGCGGCA	122
19	AlaLeuProLeuGluGlyGlyProThrGlyArgAspSerGluHisMetGlnGluAlaAla	39
123	GGAATAAGGAAAAGCAGCCTCCTGACTTTCTCTCGCTTGGTGGTTTGAGTGGACCTCCCAG	182
39	GlyIleArgLysSerSerLeuLeuThrPheLeuAlaTrpTrpPheGluTrpThrSerGln	59
183	GCCAGTGCCGGGCCCCCTCATAGGAGAGGAAGCTCGGGAGGTGGCCAGGCGGCAGGAAGGC	242
59	AlaSerAlaGlyProLeuIleGlyGluGluAlaArgGluValAlaArgArgGlnGluGly	79
243	GCACCCCCCAGCAATCCGCGCGCCGGGACAGAATGCCCTGCAGGAACCTTCTTCTGGAAG	302
79	AlaProProGlnGlnSerAlaArgArgAspArgMetProCysArgAsnPhePheTrpLys	99
303	ACCTTCTCCTCCTGCAAAATAAACCTCACCCATGAATGCTCACGCAAGTTTAATTACAGA	362
99	ThrPheSerSerCysLys***	106
363	CCTGAA	368
106		106

【図3】



【図4】

p^hCSP6
 r cortistatin
 r somatostatatin

p^hCSP6
 r cortistatin
 r somatostatatin

p^hCSP6
 r cortistatin
 r somatostatatin

【書類名】要約書

【要約】

【課題】新規生理活性ペプチドの提供。

【解決手段】配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチド、その前駆体またはそれらの塩、該ペプチドをコードするDNA、組換えベクター、形質転換体、該ペプチドの製造方法、該ペプチドを含有してなる医薬、該ペプチドに対する抗体、レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法およびスクリーニング用キット。

【効果】本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩は、例えば、ホルモン産生腫瘍、先端巨大症、巨人症、痴呆症、糖尿病、胃潰瘍などの治療・予防剤、ホルモン分泌抑制剤、腫瘍増殖抑制剤、神経活動もしくは睡眠の調節剤などの医薬として有用である。本発明のペプチドまたはその前駆体をコードするDNAは、例えば、ホルモン産生腫瘍、先端巨大症、巨人症、痴呆症、糖尿病、胃潰瘍などの遺伝子治療・予防剤、ホルモン分泌抑制剤、腫瘍増殖抑制剤、神経活動もしくは睡眠の調節剤などの医薬として有用である。さらに、本発明のDNAは、例えば、ホルモン産生腫瘍、先端巨大症、巨人症、痴呆症、糖尿病、胃潰瘍などの遺伝子診断剤として有用である。本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩に対する抗体は、本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のペプチド等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。本発明のペプチド、その前駆体またはそれらの塩は、レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするための試薬として有用である。

【選択図】なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100073955

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

武田薬品工業株式会社大阪工場内

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100077012

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 武田
薬品工業株式会社内

【氏名又は名称】 岩谷 龍

【選任した代理人】

【識別番号】 100079647

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 武田
薬品工業株式会社 大阪工場内

【氏名又は名称】 向井 洋

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日 1992年 1月22日

[変更理由] 住所変更

住 所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
氏 名 武田薬品工業株式会社